



①⑨ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 197 41 716 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 197 41 716.7
㉔ Anmeldetag: 22. 9. 97
㉕ Offenlegungstag: 25. 3. 99

⑤① Int. Cl.⁶:
G 01 N 33/53
G 01 N 33/532
G 01 N 33/543
G 01 N 33/563
G 01 N 33/60
G 01 N 33/68
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/70
C 12 Q 1/00
H 01 L 51/30

DE 197 41 716 A 1

⑦① Anmelder:
Hoechst AG, 65929 Frankfurt, DE

⑦④ Vertreter:
Patent- und Rechtsanwälte Bardehle, Pagenberg,
Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, 81679
München

⑦② Erfinder:
Windhab, Norbert, Dr., 65795 Hattersheim, DE;
Miculka, Christian, Dr., 65929 Frankfurt, DE; Hoppe,
Hans-Ullrich, Dr., 65929 Frankfurt, DE

⑤⑥ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
zu ziehende Druckschriften:

DE	195 16 179 C1
DE	42 16 696 C2
DE	197 03 718 A1
DE	196 12 356 A1
DE	35 13 168 A1
GB	22 66 182 A

US	53 49 203
US	53 42 692
US	50 87 952
EP	07 81 853 A2
EP	04 91 059 A1
WO	96 18 903 A1
WO	94 20 589 A2
WO	94 05 394 A1

KEMENY, D.M.: ELISA, Anwendung des Enzyme
Linked
Immunosorbent Assay im
biologisch/medizinischen
Labor, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, u.a.,
1994, S.23-49;
MATTHEWS, Jayne A., KRICKA, Larry J.: Analytical
Strategies for the Use of DNA Probes. In:
Analytical Biochemistry 169, 1988, H.1, S.1-25;
HANAZATO, Yoshio, et.al.: Integrated Multi-
Biosensors Based on an Ion-Sensitive Field-
Effect Transistor Using Photolithographic
Techniques. In: IEEE Transactions on Electron
Devices, Vol.36, No.7, July 1989, S.1303-1310;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Adressierbares modulares Erkennungssystem, seine Herstellung und Verwendung
- ⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Erkennungssystem enthaltend
- (a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens einer Bindestelle für die Erkennungsspezies B und
- (b) mindestens eine Erkennungsspezies B, die an die Bindungskomponente A binden kann.

DE 197 41 716 A 1

BEST AVAILABLE COPY

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Erkennungssystem enthaltend

- (a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens einer Bindestelle für die Erkennungsspezies B und
- (b) mindestens eine Erkennungsspezies B, die an die Bindungskomponente A binden kann.

Arrays sind Anordnungen von immobilisierten Erkennungsspezies, die speziell in der Analytik und Diagnostik eine wichtige Rolle bei der simultanen Bestimmung von Analyten spielen. Beispiele sind Peptide-Arrays (Fodor et al., *Nature* 1993, 364, 555) und Nucleinsäure-Arrays (Southern et al. *Genomics* 1992, 13, 1008; U.S. Patent Nr. 5,632,957).

In der experimentellen Analytik lassen Arrays durch die lokalisierte Erzeugung von Ereignissen eine besonders einfache, schnelle und reproduzierbare Datenanalyse zu. Beispiele hierfür reichen vom physikalischen Mehrkanaldetektor bis hin zu Mikrotiterplatten in der Labormedizin.

Arrays dienen auch zur Speicherung und Verarbeitung von Informationen und sind das grundlegende Konstruktionselement der Nanotechnologie.

Weitere wichtige Anwendungsbereiche sind in der Biologie, Biochemie, Medizin und Pharmakologie zu finden. So wird in EP-A1-0 461 462 ein Immunoassay beschrieben, bei dem feldartig positionierte und immobilisierte Antigene mit einem oder mehreren Antikörpern in Kontakt gebracht werden. In WO 96/01836 wird beispielsweise ein Array von DNA-Molekülen unterschiedlicher Sequenz beschrieben, der zur Detektion von Genabschnitten dient und so beispielsweise zur Diagnose pathogener Bakterien führt.

Immobilisierung durch supramolekulare Wechselwirkungen sind auch außerhalb der Array-Anwendungen bekannt. So können Träger mit Anti-Antikörpern über ein kovalent an den Träger gebundenes Antigen fixiert werden. Die Analytik von Immunoassays basiert weitgehend auf Enzym-Immunoassays (EIAs), bei denen eine enzymatisch katalysierte Reaktion die Präsenz eines Antigen-Antikörper- oder eines Antikörper-Antikörper-Komplexes anzeigt. Eine der am Komplex beteiligten Einheiten ist hierbei entweder an einem Träger immobilisiert oder selbst ein Träger, z. B. in Form von Gewebsbestandteilen.

Derartige Signalverstärkungsverfahren haben jedoch insbesondere bezüglich der Verlässlichkeit der qualitativen Aussage wie auch der Quantifizierung Nachteile. Ein besonderer Nachteil von miniaturisierten Arrays sind der Aufwand und die Kosten bei der Herstellung.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war daher, ein Erkennungssystem zu finden, das einfach, zuverlässig, hochselektiv und zudem billig ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Erkennungssystem enthaltend

- (a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens einer Bindestelle für die Erkennungsspezies B und
- (b) mindestens eine Erkennungsspezies B, die an die Bindungskomponente A binden kann.

Eine bevorzugte Ausführungsform ist ein Erkennungssystem, bei dem die Bindung der Bindungskomponente A an die Erkennungsspezies B in Form eines molekularen Paarungssystems erfolgt.

Solche Paarungssysteme sind supramolekulare Systeme

nicht-kovalenter Wechselwirkung, die sich durch Selektivität, Stabilität und Reversibilität auszeichnen, und deren Eigenschaften bevorzugt thermodynamisch, d. h. durch Temperatur, pH-Wert und Konzentration beeinflusst werden. Solche Paarungssysteme können z. B. aufgrund ihrer selektiven Eigenschaften auch als "molekularer Klebstoff" für die Zusammenführung von unterschiedlichen Metallclustern zu Cluster-Verbänden mit potentiell neuen Eigenschaften verwendet werden [siehe z. B. R. L. Letsinger, et al., *Nature* 1996, 382, 607-9; P. G. Schultz et al., *Nature* 1996, 382, 609-11].

Daher ist es besonders vorteilhaft, wenn das Paarungssystem einen Komplex darstellt, der durch Assoziation der Bindungskomponente A mit der Erkennungsspezies B über nichtkovalente Wechselwirkungen gebildet wird. Die nichtkovalenten Wechselwirkungen sind insbesondere Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Stapelungen ("Stacking"), Metallligandierungen, Charge-Transfer-Komplexe und hydrophobe Wechselwirkungen.

In einer besonderen Ausführungsform enthält das molekulare Paarungssystem gemäß der vorliegenden Erfindung eine Nucleinsäure und deren Analoga, insbesondere in Form einer Pentose, vorzugsweise einer Pentopyranose oder Pentofuranose. Im allgemeinen ist die Pentose ausgewählt aus einer Ribose, Arabinose, Lyxose oder Xylose. Besonders bevorzugt ist Pyranosyl-RNA (p-RNA), Nucleinsäure mit einer oder mehreren Aminocyclohexylethansäure (CNA)-Einheiten, peptidische Nucleinsäure (PNA), oder einer Nucleinsäure mit einer oder mehreren [2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-Nucleobasen. Besonders bevorzugt sind Pyranosyl-Nucleinsäuren (p-NA's) und vor allem p-RNA's.

p-NA's sind im allgemeinen zur natürlichen RNA isomere Strukturtypen, bei denen die Pentose-Einheiten in der Pyranoseform vorliegen und durch Phosphodiestergruppen zwischen den Positionen C-2' und C-4' repetitiv verknüpft sind. Unter "Nucleobase" werden dabei die kanonischen Nucleobasen A; T, U, C, G, aber auch die Paare Isoguanin/Isocytosin und 2,6-Diaminopurin/Xanthin und im Sinne der vorliegenden Erfindung auch andere Purine und Pyrimidine wie Purin, 2,6-Diaminopurin, 6-Purinthiol, Pyridin, Pyrimidin, Isoguanin, 6-Thioguanin, Xanthin, Hypoxanthin, Isocytosin, Indol, Tryptamin, N-Phthaloyltryptamin, Coffein, Theobromin, Theophyllin, Benzotriazol oder Acridin, verstanden, und vorzugsweise Ribopyranosyladenosin, Ribopyranosylguanosin, Ribopyranosylthymidin; Ribopyranosylcytosin, Ribopyranosyltryptamin oder Ribopyranosyl-N-phthalotryptamin, Ribopyranosyl-uracil oder deren [2-Amino-4-(carboxymethyl)-ribopyranosyl]-Derivate.

p-NA's, und zwar die von der Ribose abgeleitete p-RNA's, wurden zum erstenmal von Eschenmoser et al. beschrieben (Helv. Chim. Acta 1993, 76, 2161; Helv. Chim. Acta 1995, 78, 1621; Angew. Chem. 1996, 108, 1619-1623). Sie bilden ausschließlich sogenannte Watson-Crick-gepaarte, d. h. Purin-Pyrimidin- und Purin-Purin-gepaarte, antiparallele, reversibel "schmelzende", quasi-lineare und stabile Duplices. Homochirale p-RNA-Stränge entgegengesetzten Chiralitätssinns paaren ebenfalls kontrollierbar und sind in der gebildeten Duplex streng nicht-helical. Diese für den Aufbau supramolekularer Einheiten wertvolle Spezifität hängt mit der relativ geringen Flexibilität des Ribopyranosephosphat-Rückgrats sowie mit der starken Neigung der Basenebene zur Strangachse und der hieraus folgenden Tendenz zu intercatenärer Basenstapelung im resultierenden Duplex zusammen und läßt sich letztlich auf die Teilnahme eines 2',4'-cis-disubstituierten Ribopyranose-riams am Aufbau des Rückgrates zurückführen.

Diese wesentlich besseren Paarungseigenschaften ma-

chen p-NA's gegenüber DNA und RNA für die Anwendung des Aufbaus supramolekularer Einheiten zu bevorzugten Paarungssystemen. Sie bilden ein zu natürlichen Nucleinsäuren orthogonales Paarungssystem, d. h. sie paaren nicht mit in der natürlich Form vorkommenden DNA's und RNA's, was im besonderen im diagnostischen Bereich vorteilhaft ist.

p-NA's eignen sich daher besonders für die Anwendung im Bereich der Nanotechnologie, beispielsweise zur Herstellung neuer Materialien, Diagnostika und Therapeutika sowie mikroelektronischer, photonischer bzw. optoelektronischer Bauteile und für das kontrollierte Zusammenführen molekularer Species zu supramolekularen Einheiten, wie z. B. für den (kombinatorischen) Aufbau von Proteinassemblies [siehe z. B. A. Lombardi, J. W. Bryson, W. F. De-Grado, *Biomoleküls (Pept. Sci.)* 1997, 40, 495-504], da p-NA's, und besonders p-RNA's Paarungssysteme bilden, die stark und thermodynamisch kontrollierbar sind. Eine weitere Anwendung ergibt sich daher gerade im diagnostischen und drug discovery-Bereich durch die Möglichkeit, funktionelle, bevorzugt biologische Einheiten wie Proteine oder DNA/RNA-Abschnitte, z. B. mit einem p-RNA-Code zu versehen, der nicht mit den natürlichen Nucleinsäuren interferiert (siehe z. B. WO93/20242).

Die Länge der Nucleinsäure und deren Analoga ist gemäß der vorliegenden Erfindung mindestens ca. 4-50, vorzugsweise mindestens ca. 4-25, insbesondere mindestens ca. 4-15, vor allem mindestens ca. 4-10 Nukleotide.

Im allgemeinen ist die Bindungskomponente A an einem Träger immobilisiert.

Unter dem Begriff "immobilisiert" versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung die Ausbildung einer kovalenten Bindung, quasi-kovalenten Bindung oder supramolekularen Bindung durch Assoziation von zwei oder mehreren molekularen Spezies wie linear konstituierte Moleküle, insbesondere Peptide, Peptoide, Proteine, lineare Oligo- oder Polysaccharide, Nucleinsäuren und deren Analoga, oder Monomere wie Heterocyclen, insbesondere Stickstoffheterocyclen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder Antikörper und deren funktionelle Teile. Funktionelle Teile von Antikörper sind beispielsweise Fv-Fragmente (Skerra Plückthun (1988) *Science* 240, 1038), einzelkettige Fv-Fragmente (scFv; Bird et al. (1988), *Science* 242, 423; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 5879) oder Fab-Fragmente (Better et al. (1988) *Science* 240, 1041).

Die Trägerung erfolgt somit im allgemeinen kovalent, quasi-kovalent, supramolekular oder physikalisch wie magnetisch (A. R. Shepard et al. (1997) *Nucleic Acids Res.*, 25, 3183-3185, Nr. 15), im elektrischen Feld oder durch einen Molekularsieb. Die Bindungskomponente A wird hierdurch entweder direkt an der Position des Trägers synthetisiert oder an bestimmte Positionen des Trägers "gelinkt". Beispiele sind Konjugations- und Trägervverfahren über Peroxidoxidation und reduktiver Aminierung der Schiffbase, N-Hydroxysuccinimidester von vorzugsweise Dicarbonsäurelinker, Ethylendiaminphosphoamidatlinker, Mercapto-, Jodacetyl- oder Maleinimido-Verfahren und/oder kovalente oder nicht-kovalente Biotin-Linker-Verfahren.

Als Trägermaterialien eignen sich beispielsweise Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien bzw. dünne Schichten des Trägers, insbesondere der genannten Materialien, oder (bio)molekulare Filamente wie Cellulose, Gerüstproteine.

Eine besondere Ausführungsform ist daher ein erfindungsgemäßes Erkennungssystem, bei dem die Bindungskomponente A an einen Träger über eine kovalente Bindung, quasi-kovalente Bindung oder supramolekulare Bin-

dung durch Assoziation von zwei oder mehreren molekularen Spezies wie linear konstituierte Moleküle, insbesondere Peptide, Peptoide, Proteine, lineare Oligo- oder Polysaccharide, Nucleinsäuren und deren Analoga, oder Monomere wie Heterocyclen, insbesondere Stickstoffheterocyclen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder Antikörper und deren funktionelle Teile wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente, immobilisiert ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist die Bindungskomponente A an definierten Stellen des Trägers, insbesondere in Form einer Matrix, immobilisiert, wobei die definierten Stellen des Trägers vorzugsweise adressiert sind.

Gemäß dem bevorzugten Erkennungssystem wird daher ein Molekül in der mobilen (Puffer)-Phase mit der entsprechenden Komplementärsequenz nur an der Position der passenden Adresse einen supramolekularen Komplex spontan ausbilden. Sind an diese mobile Komplementäradresse durch chemische (Konjugate) oder supramolekulare Verbindungsbildung (Komplexe) weitere Einheiten mit besonderen Funktionen wie z. B. der eines Antikörpers gebunden, wird je nach verwendeten Adressenmuster auf demselben Immobilisat-Array ein unterschiedlicher Funktionsarray aufgespannt.

Die großen Vorteile eines solchen modularen Systems sind die identische einmalige Bereitstellung der Trägereinheiten für unterschiedlichste Anwendungen und die in situ Erzeugung nichthalbarer Bio-Konjugate etwa aus Proteinen, Enzymen oder lebenden Zellen und dem Paarungsrest.

Ein weiterer Vorteil ist die schrittweise Erzeugung von Substratbindungsereignis und dem meßbaren Bindungsereignis an der Trägerposition, d. h. das Substrat kann völlig ungehindert einen ersten Komplex mit der löslichen, adressierten Komponente (Erkennungsspezies B) bilden und anschließend im Raum der Trägerposition paarend an die Bindungskomponente A immobilisieren.

Es ist ferner besonders bevorzugt, wenn die Bindungskomponente A an eine Träger-Elektrode des Trägers immobilisiert ist, da beispielsweise durch eine Signalverstärkung des Impedanzverhaltens von Träger-Elektroden bei Bindungsereignissen ein elektronisch lesbares Signal erzeugt wird. Entsprechende Elektrodenprozesse sind bei R. P. Andres (1996) *Science*, 272, 1323-1325 und entsprechende Impedanzmessungen sind bei M. Stelzle et al. (1993) *J. of Physical Chem.*, 97, 2974-2981 beschrieben.

Als Erkennungsspezies B ist beispielsweise ein Biomolekül geeignet, welches z. B. ausgewählt ist aus einem Peptid, Peptoid, Protein wie Rezeptor oder funktionelle Teile davon wie die extrazelluläre Domäne eines Membranständigen Rezeptors, Antikörper oder funktionelle Teile davon wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente, oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine, Filamentbestandteile, oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside, oder Viroide, oder deren Derivate wie Acetate und deren wirksame Teile, oder Substanzbibliotheken wie Ensembles von sich strukturell unterscheidenden Verbindungen, vorzugsweise oligomere oder polymere Peptide, Peptoide, Saccharide, Nucleinsäuren.

Üblicherweise enthält das Biomolekül eine Binderegion für die Bindungskomponente A; die vorzugsweise eine der oben beschriebenen Nucleinsäuren oder deren Analoga darstellt. Im allgemeinen wird hierbei das Biomolekül an eine ausgewählte Nucleinsäure oder Analogon über einen Linker gebunden. Beispielsweise eignet sich ein Uracil-basierender Linker, bei dem vorzugsweise die 5-Position des Uracils modifiziert wurde, z. B. N-Phthaloylaminoethyluracil, aber auch ein Indol-basierender Linker, vorzugsweise Tryptamininderivate, wie z. B. N-Phthaloyltryptamin.

In einer besonderen Ausführungsform enthält die immobilisierte Bindungskomponente A verschiedene Bindestellen für verschiedene Erkennungsspezien B, wodurch verschiedene Erkennungsspezien B an der Bindungskomponente A binden können.

In einer weiteren Ausführungsform ist mindestens eine weitere Erkennungsspezies B an die Bindungskomponente A immobilisiert.

Daher ist ein weiteres erfindungsgemäßes Erkennungssystem dadurch gekennzeichnet, daß es

- (a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens $2+n$ verschiedenen Bindestellen für mindestens $2+n$ verschiedene Erkennungsspezien $B_1, B_2 \dots B_n$ und eine weitere von der Erkennungsspezies $B_1, B_2 \dots B_n$ verschiedene Erkennungsspezies $B(n+3)$, die an die immobilisierte Bindungskomponente A immobilisiert ist, und
- (b) mindestens $(n+3)$ verschiedene Erkennungsspezien $B_1, B_2 \dots B(n+3)$, wobei n eine ganze Zahl von 0–20, vorzugsweise 0–10, insbesondere 0–5, vor allem 0 oder 1 bedeutet.

In einer weiteren Ausgestaltung stammt die Erkennungsspezies $B_1, B_2 \dots B_n$ aus einer Substanzbibliothek.

Zur Strukturanalyse eines Komplexes aus einer Substanzbibliothek ist es besonders vorteilhaft, wenn die Struktur der Erkennungsspezies $B(n+3)$ bekannt ist, und/oder die verschiedenen Erkennungsspezien B dasselbe Substrat S erkennen.

Das Substrat S ist im allgemeinen ausgewählt aus Moleküle, vorzugsweise Arzneistoffe und Pflanzenschutzwirkstoffe, Metaboliten, physiologische Botenstoffe, Derivate von Leitstrukturen, Substanzen, die im menschlichen oder tierischen Körper im Fall von krankhaften Veränderungen produziert oder im erhöhten Maß produziert werden, oder Übergangszustandsanaloge, oder Peptide, Peptoide, Proteine wie Rezeptoren oder funktionelle Teile davon wie die extrazelluläre Domäne eines Membran-ständigen Rezeptors, Antikörper oder funktionelle Teile davon wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente, oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine, Filamentbestandteile, oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside, oder Viroide, oder deren Derivate wie Acetate, oder Monomere wie Heterozyklen, insbesondere Stickstoffheterozyklen, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide, oder Substanzbibliotheken wie Ensembles von sich strukturell unterscheidenden Verbindungen, vorzugsweise oligomere oder polymere Peptide, Peptoide, Saccharide, Nucleinsäuren, Ester, Acetale oder Monomere wie Heterocyklen, Lipide, Steroide, oder Angriffstrukturen von Pharmaka, vorzugsweise Arzneimittelseptoren, spannungsabhängige Ionenkanäle, Transporter, Enzyme oder Biosynthese-Einheiten von Mikroorganismen.

Substanzbibliotheken sind dem Fachmann aus dem Bereich der kombinatorischen Chemie bekannt. Beispiele sind die leicht zugänglichen Peptidbibliotheken, erzeugt durch Permutation der Peptidsequenz. Paaren solche Bibliotheken, entstehen völlig neue Supra-Moleküle bzw. Komplexe. Die beachtliche Anzahl möglicher Komplexe beinhaltet möglicherweise Erkennungsregionen für Substrat-Moleküle, ähnlich dem Epitop eines Antikörpers. Die Ausführungsform läßt dann ein Screening eines solchen stochastischen Bindungsereignisses zu. Ist eine der Konjugatbibliotheken an den Träger gebunden, kann durch die Codonadresse bzw. bei gleichbleibender Adresse durch seine bloße Position direkt seine Identität (z. B. die Peptidsequenz) festgelegt werden. Der Array erzeugt für einen der Paarungsstränge eine

sogenannte codierte Bibliothek und vereinfacht die Komplexeanalytik der supramolekularen Bibliothek.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stellt das erfindungsgemäße Erkennungssystem einen Immunoassay dar.

Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Verfahren zur Identifizierung eines Substrates S in einer Probe mit Hilfe des erfindungsgemäßen Erkennungssystems, bei dem

- (a) eine Erkennungsspezies B, die das Substrat S erkennt, mit der Probe in Kontakt gebracht wird,
- (b) gleichzeitig oder nacheinander mit einer immobilisierten Erkennungsspezies B in Kontakt gebracht wird, und
- (c) die Bildung eines Komplexes aus immobilisierter Bindungskomponente A, Erkennungsspezies B und Substrat S nachgewiesen wird.

Insbesondere wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die Bildung des Komplexes über physikalische Parameter wie Temperatur, Salze, Lösungsmittel, elektrophoretische Vorgänge gesteuert.

Im allgemeinen wird der sich gebildete Komplex über eine Markierung wie eine radioaktive oder fluoreszierende Markierung, enzymatische Markierung, Redoxmarkierung, Spinnmarkierung der Erkennungsspezies B nachgewiesen, oder über den Komplex selbst, beispielsweise über Elektrodenprozesse wie über chemische Prozesse, z. B. Redoxprozesse in der Umgebung oder an der Elektrode oder über eine physikalische Meßgröße wie über Impedanzmessung oder Gleichstrommessung.

Besondere Amplifizierungs- oder Vorkonzentrierungsschritte der Substrate werden somit für viele Anwendungen nicht benötigt, was besonders vorteilhaft ist. Die chemische und physikalische Heterogenität der Positionen vor und nach den Paarungsereignissen kann zudem mit dem direktelektronischen Verfahren sehr vorteilhaft durch Parametrisierung bzw. Eichung über die Software eliminiert werden.

Das Problem, daß wichtige Substratmoleküle für solche Anwendungen Moleküle der natürlichen Paarungssysteme DNA und RNA selbst sein können und somit mit der Adressierung in störende Wechselwirkung treten würden, wird dadurch gelöst, daß besonders stabile, selektive und nicht-natürliche Paarungssysteme, wie z. B. p-NA's, verwendet werden.

Die vorliegende Erfindung bezieht sich daher auch auf ein Verfahren, mit dem Erkennungsspecies, bevorzugt natürliche DNA- oder RNA-Stränge und Proteine, dabei bevorzugt Antikörper oder funktionelle Teile von Antikörpern, durch p-NA-Abschnitte, bevorzugt p-RNA-Abschnitte, eindeutig codiert werden. Diese können dann mit den zugehörigen Codons auf einem festen Träger hybridisiert werden. Damit kann auf einem festen Träger, der in Form eines Arrays mit Codons ausgestattet ist, nur durch Einstellung von Hybridisierungsbedingungen mit immer neuen Kombinationen von Erkennungsspecies an den gewünschten Positionen immer neue, diagnostisch nützliche Arrays aufgebaut werden. Wird dann der Analyt, beispielsweise eine biologische Probe wie Serum o. ä. aufgebracht, dann werden die zu detektierenden Species in einem bestimmten Muster auf dem Array gebunden, welches dann indirekt (z. B. durch Fluoreszenzmarkierung der Erkennungsspecies) oder direkt (z. B. durch Impedanzmessung am Anknüpfungspunkt der Codons) registriert wird. Dann wird die Hybridisierung durch geeignete Bedingung aufgehoben (Temperatur, Salze, Lösungsmittel, elektrophoretische Vorgänge), so daß wieder nur der Träger mit den Codons zurückbleibt. Dieser wird dann erneut mit ande-

ren Erkennungsspecies beladen und wird z. B. für den gleichen Analyten für die Ermittlung eines anderen Musters verwendet. Die immer neue Anordnung von Erkennungsspecies im Array-Format und die Verwendung von p-NA's als Paarungssysteme ist gegenüber anderen Systemen, siehe z. B. WO 96/13522, besonders vorteilhaft.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren kann in einem weiteren Schritt der Komplex aus Erkennungsspezies B und Substrat S auch isoliert werden. Hierzu wird z. B. der Komplex aus Erkennungsspezies B und Substrat S nach Einfrieren des Bindungsgleichgewichts oder kovalentes Cross-Linking von Erkennungsspezies B und Substrat S isoliert.

Das erfindungsgemäße Erkennungssystem eignet sich folglich besonders gut zum Auffinden eines Substrates S, zur Diagnose, zur Herstellung eines Katalysators und/oder zur Herstellung eines elektronischen Bauteils, insbesondere zum Auffinden, zur Optimierung und/oder zur Herstellung eines Arzneiwirkstoffes oder Pflanzenschutzwirkstoffes.

Je nach den synthetisierten Adressen können somit für unterschiedliche Fragestellungen bzw. diagnostische Probleme schnell Kits zusammengestellt werden, die auf dem existierenden Codon-Array in situ das Testsystem durch Paarung bildet. Bevorzugt werden Biomoleküle, z. B. ganz allgemein Zell- oder Virus-Bestandteile, ganz besonders monoklonale Antikörper oder deren funktionelle Teile.

Die folgenden Figuren sollen die Erfindung näher beschreiben, ohne sie zu beschränken.

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

Fig. 1 zeigt schematisch das allgemeine Prinzip einer Erkennungsspezies, die in situ um ein zu erkennendes Substrat erzeugt wird. Die Komplexierungseinheit (Pepid) kann durch eine Trägermatrix bekannt sein. Hierbei bildet sich eine thermodynamisch oder kinetisch kontrolliert konstituierte Bindungstasche als Komplex mit dem Substrat. Die zu allen B-Einheiten komplementäre Paarungseinheit A ist am Träger fixiert (immobilisiert).

Fig. 2 zeigt schematisch eine Anordnung von immobilisierten Erkennungsstrukturen (Arrays) auf einem festen Träger.

Fig. 3 zeigt schematisch die modulare Erzeugung eines supramolekularen Arrays. Auf dem gleichen Anticodon-Träger werden durch Adressierung mit den selektiven Paarungsregionen unterschiedliche Immunoarrays aufgebaut.

Fig. 4 zeigt schematisch den Aufbau eines Arrays mit 4 Trägerpositionen (Elektroden) und das Meßprinzip.

Fig. 5 zeigt schematisch UV-spektroskopisch und Impedanz-spektroskopisch den Nachweis der Paarung der Anticodon-Codon-Moleküle. Durch Temperaturerniedrigung paaren die Stränge, der Pufferüberstand verarmt, die UV-Extinktion des Überstandes nimmt ab bzw. die Veränderung der Elektroden Doppelschicht wirkt auf die Impedanzmessung.

Fig. 6 zeigt schematisch die Funktionsweise eines adressierten Immunoarrays. Lediglich Elektrode 3 trägt die passende Adresse zu einem Antikörper-Paarungsstrang-Konjugat. Wird das passende Antigen zugegeben, verändert sich die Impedanz an der Elektrode 1 anders als durch bloße Pufferveränderung an den anderen Elektroden.

Patentansprüche

1. Erkennungssystem enthaltend

- (a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens einer Bindestelle für die Erkennungsspezies B und
- (b) mindestens eine Erkennungsspezies B, die an

die Bindungskomponente A binden kann.

2. Erkennungssystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindung der Bindungskomponente A an die Erkennungsspezies B in Form eines molekularen Paarungssystems erfolgt.
3. Erkennungssystem nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Paarungssystem einen Komplex darstellt, der durch Assoziation der Bindungskomponente A mit der Erkennungsspezies B über nicht-kovalente Wechselwirkungen gebildet wird.
4. Erkennungssystem nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die nicht-kovalenten Wechselwirkungen ausgewählt sind aus Wasserstoffbrücken, Salzbrücken, Stapelung ("Stacking"), Metalligandierungen, Charge-Transfer-Komplexe und hydrophobe Wechselwirkungen.
5. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß das molekulare Paarungssystem eine Nucleinsäure und deren Analoga enthält.
6. Erkennungssystem nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäuren und deren Analoga eine Pentose, vorzugsweise eine Pentopyranose oder Pentofuranose ist.
7. Erkennungssystem nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Pentose ausgewählt ist aus einer Ribose, Arabinose, Lyxose oder Xylose.
8. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 5-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäure und deren Analoga ausgewählt ist aus Pyranosyl-RNA (p-RNA), Nucleinsäure mit einer oder mehreren Aminocyclohexylethansäure(CNA)-Einheiten, peptidische Nucleinsäure (PNA), oder einer Nucleinsäure mit einer oder mehreren [2-Amino-4-(carboxymethyl)cyclohexyl]-Nucleobasen.
9. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 5-8, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleobase der Nucleinsäure oder deren Analoga ausgewählt ist aus Purin, 2,6-Diaminopurin, 6-Purinthiol, Pyridin, Pyrimidin, Adenin, Guanin, Isoguanin, 6-Thioguanin, Xanthin, Hypoxanthin, Thymidin, Cytosin, Isocytosin, Indol, Tryptamin, N-Phthaloyltryptamin, Uracil, Coffein, Theobromin, Theophyllin, Benzotriazol oder Acridin.
10. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 5-9, dadurch gekennzeichnet, daß die Nucleinsäureanaloga ausgewählt sind aus Ribopyranosyladenosin, Ribopyranosylguanosin, Ribopyranosylthymidin, Ribopyranosylcytosin, Ribopyranosyltryptamin oder Ribopyranosyl-N-phthalotryptamin, Ribopyranosyl-uracil oder deren [2-Amino-4-(carboxymethyl)ribopyranosyl]-Derivate.
11. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 5-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Länge der Nucleinsäure und deren Analoga mindestens ca. 4-50, vorzugsweise mindestens ca. 4-25, insbesondere mindestens ca. 4-15, vor allem mindestens ca. 4-10 Nukleotide ist.
12. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-11, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungskomponente A an einem Träger immobilisiert ist.
13. Erkennungssystem nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Träger ausgewählt ist aus Keramik, Metall, insbesondere Edelmetall, Gläser, Kunststoffe, kristalline Materialien bzw. dünne Schichten des Trägers, insbesondere der genannten Materialien, oder (bio)molekulare Filamente, wie Cellulose, Gerüstproteine.
14. Erkennungssystem nach Anspruch 12 oder 13, da-

- durch gekennzeichnet, daß die Bindungskomponente A an einen Träger über eine kovalente Bindung, quasi-kovalente Bindung oder supramolekulare Bindung durch Assoziation von zwei oder mehreren molekularen Spezies wie linearkonstituierte Moleküle, insbesondere Peptide, Peptoide, Proteine, lineare Oligo- oder Polysaccharide, Nucleinsäuren und deren Analoga, oder Monomere wie Heterocyclus, insbesondere Stickstoffheterocyclus, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide oder Antikörper und deren funktionelle Teile wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente, immobilisiert ist.
15. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 12-14, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungskomponente A an definierten Stellen des Trägers, vorzugsweise in Form einer Matrix, immobilisiert ist.
16. Erkennungssystem nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die definierten Stellen des Trägers adressiert sind.
17. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 12-16, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungskomponente A an eine Träger-Elektrode des Trägers immobilisiert ist.
18. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-17 dadurch gekennzeichnet, daß die Erkennungsspezies B ein Biomolekül ist.
19. Erkennungssystem nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß das Biomolekül ausgewählt ist aus Peptid, Peptoid, Protein wie Rezeptor oder funktionelle Teile davon wie die extrazelluläre Domäne eines Membranständigen Rezeptors, Antikörper oder funktionelle Teile davon wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente, oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine, Filamentbestandteile, oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside, oder Viroide, oder deren Derivate wie Acetate und deren wirksame Teile, oder Substanzbibliotheken wie Ensembles von sich strukturell unterscheidenden Verbindungen, vorzugsweise oligomere oder polymere Peptide, Peptoide, Saccharide, Nucleinsäuren.
20. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-19, dadurch gekennzeichnet, daß die immobilisierte Bindungskomponente A verschiedene Bindestellen für verschiedene Erkennungsspezies B enthält, wodurch verschiedene Erkennungsspezies B an der Bindungskomponente A binden können.
21. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-20, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine weitere Erkennungsspezies B an die Bindungskomponente A immobilisiert ist.
22. Erkennungssystem nach Anspruch 20 oder 21, dadurch gekennzeichnet, daß es
- (a) mindestens eine immobilisierte Bindungskomponente A mit mindestens $2+n$ verschiedenen Bindestellen für mindestens $2+n$ verschiedene Erkennungsspezies B₁, B₂ ... B_n und eine weitere von der Erkennungsspezies B₁, B₂ ... B_n verschiedene Erkennungsspezies B(n+3), die an die immobilisierte Bindungskomponente A immobilisiert ist, und
 - (b) mindestens (n+3) verschiedene Erkennungsspezies B₁, B₂ ... B(n+3),
- wobei n eine ganze Zahl von 0-20, vorzugsweise 0-10, insbesondere 0-5, vor allem 0 oder 1 bedeutet.
23. Erkennungssystem nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkennungsspezies B₁, ... B_n aus einer Substanzbibliothek stammt.

24. Erkennungssystem nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Struktur der Erkennungsspezies B(n+3) bekannt ist.
25. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 20-24, dadurch gekennzeichnet, daß die verschiedenen Erkennungsspezies B dasselbe Substrat S erkennen.
26. Erkennungssystem nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß das Substrat S ausgewählt ist aus Moleküle, vorzugsweise Arzneistoffe und Pflanzenschutzwirkstoffe, Metaboliten, physiologische Botenstoffe, Derivate von Leitstrukturen, Substanzen, die im menschlichen oder tierischen Körper im Fall von krankhaften Veränderungen produziert oder im erhöhten Maß produziert werden, oder Übergangszustandsanaloga, oder Peptide, Peptoide, Proteine wie Rezeptoren oder funktionelle Teile davon wie die extrazelluläre Domäne eines Membranständigen Rezeptors, Antikörper oder funktionelle Teile davon wie Fv-Fragmente, einzelkettige Fv-Fragmente (scFv) oder Fab-Fragmente, oder Zellbestandteile wie Lipide, Glykoproteine, Filamentbestandteile, oder Viren, Virenbestandteile wie Kapside, oder Viroide, oder deren Derivate wie Acetate, oder Monomere wie Heterozyclus, insbesondere Stickstoffheterozyclus, oder nichtlinear konstituierte Moleküle wie verzweigte Oligo- oder Polysaccharide, oder Substanzbibliotheken wie Ensembles von sich strukturell unterscheidenden Verbindungen, vorzugsweise oligomere oder polymere Peptide, Peptoide, Saccharide, Nucleinsäuren, Ester, Acetale oder Monomere wie Heterocyclus, Lipide, Steroide, oder Angriffsstrukturen von Pharmaka, vorzugsweise Arzneimittelrezeptoren, spannungs-abhängige Ionenkanäle, Transporter, Enzyme oder Biosynthese-Einheiten von Mikroorganismen.
27. Erkennungssystem nach einem der Ansprüche 1-26, dadurch gekennzeichnet, daß es einen Immunoassay darstellt.
28. Verfahren zur Identifizierung eines Substrates S in einer Probe mit Hilfe des Erkennungssystems gemäß einem der Ansprüche 1-27, dadurch gekennzeichnet, daß
- (a) eine Erkennungsspezies B, die das Substrat S erkennt, mit der Probe in Kontakt gebracht wird,
 - (b) gleichzeitig oder nacheinander mit einer immobilisierten Erkennungsspezies B in Kontakt gebracht wird, und
 - (c) die Bildung eines Komplexes aus immobilisierter Bindungskomponente A, Erkennungsspezies B und Substrat S nachgewiesen wird.
29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Bildung des Komplexes über physikalische Parameter wie Temperatur, Salze, Lösungsmittel, elektrophoretische Vorgänge gesteuert wird.
30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß der Komplex über eine Markierung wie eine radioaktive oder fluoreszierende Markierung, enzymatische Markierung, Redoxmarkierung, Spinnmarkierung der Erkennungsspezies B nachgewiesen wird, oder über den Komplex selbst, beispielsweise über Elektrodenprozesse wie über chemische Prozesse, z. B. Redoxprozesse in der Umgebung oder an der Elektrode oder über eine physikalische Meßgröße wie über Impedanzmessung oder Gleichstrommessung.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 28-30, dadurch gekennzeichnet, daß in einem weiteren Schritt der Komplex aus Erkennungsspezies B und Substrat S isoliert wird.
32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet,

zeichnet, daß der Komplex aus Erkennungsspezies B und Substrat S nach Einfrieren des Bindungsgleichgewichts oder kovalentes Cross-Linking von Erkennungsspezies B und Substrat S isoliert wird.

33. Verwendung des Erkennungssystems gemäß einem der Ansprüche 1-27 zum Auffinden eines Substrates S, zur Diagnose, zur Herstellung eines Katalysators und/oder zur Herstellung eines elektronischen Bauteils, insbesondere zum Auffinden, zur Optimierung und/oder zur Herstellung eines Arzneiwirkstoffes oder Pflanzenschutzwirkstoffes.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

15

20

25

30

35

40

45

50

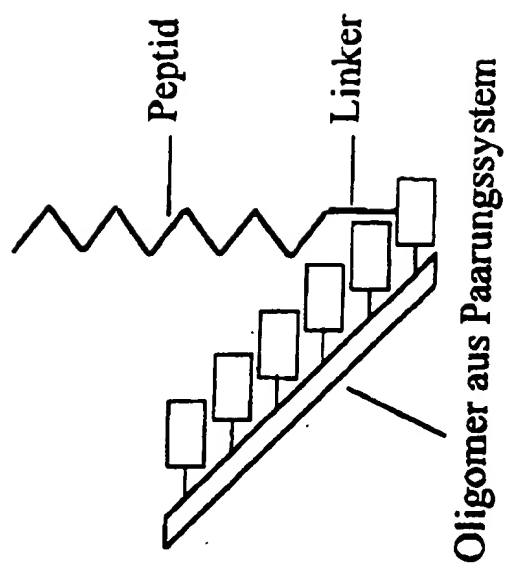
55

60

65

- Leerseite -

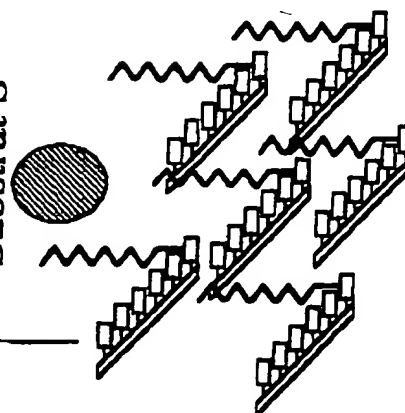
Fig. 1



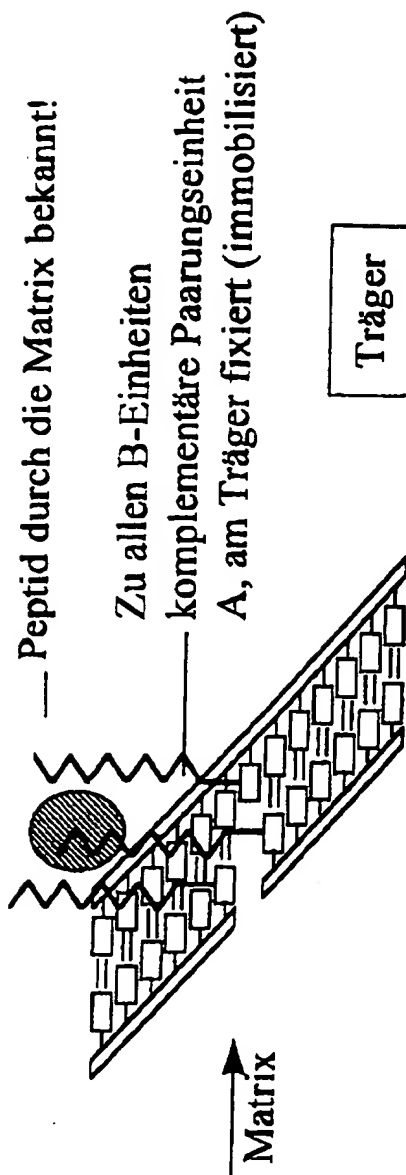
Oligomer aus Paarungssystem

Bibliothekseinheit B_i, nicht geträgert

Substrat S



Thermodynamisch oder kinetisch kontrolliert
konstituierte Bindungstasche als Komplex
mit dem Substrat.



— Peptid durch die Matrix bekannt!

Zu allen B-Einheiten

komplementäre Paarungseinheit

A, am Träger fixiert (immobilisiert)

Träger

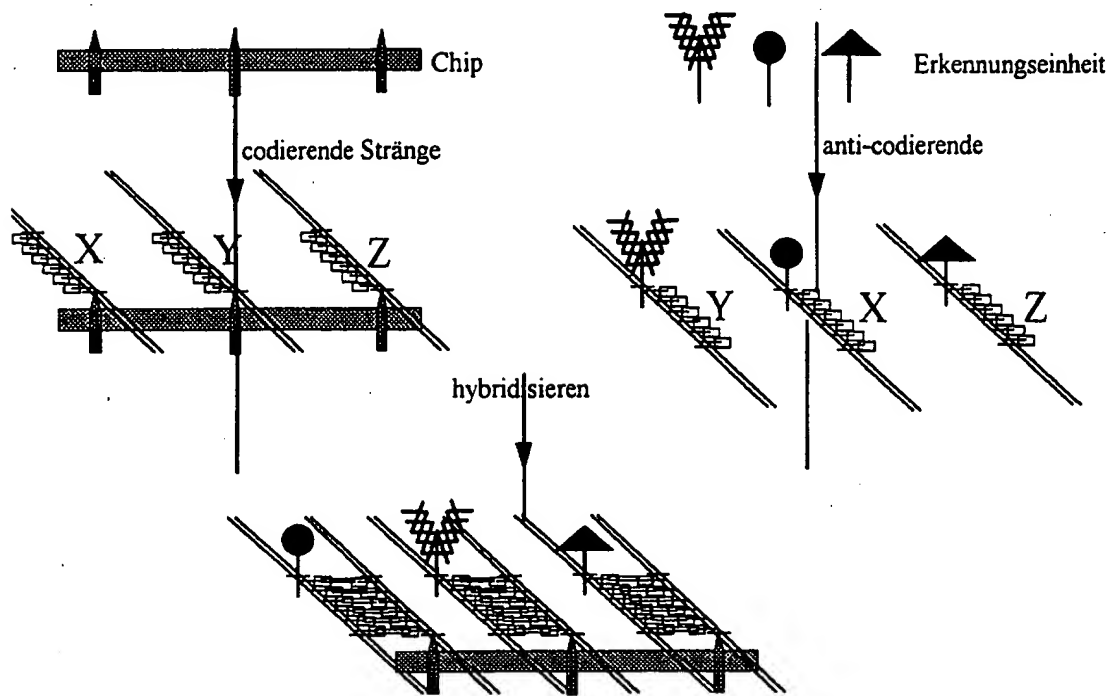


Fig. 2

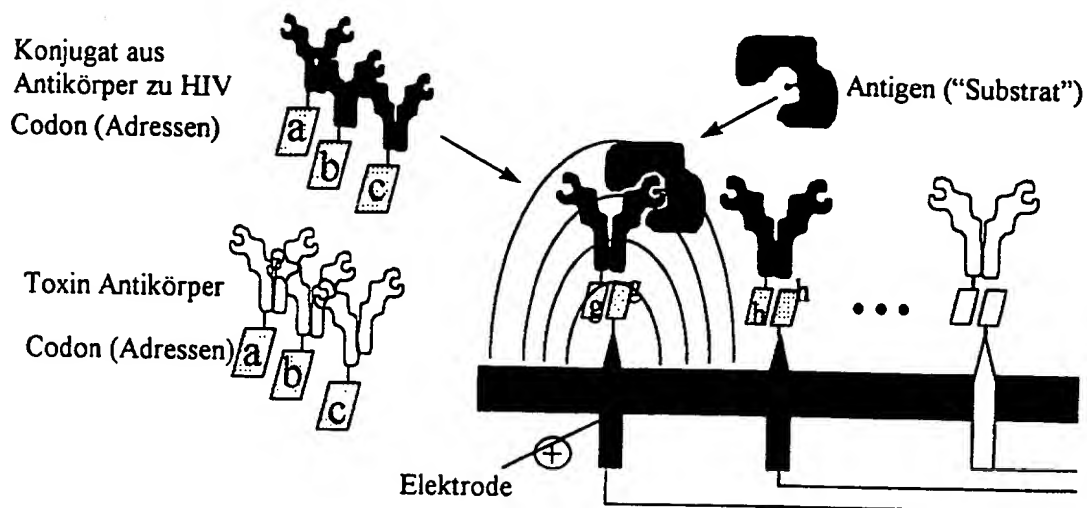


Fig. 3

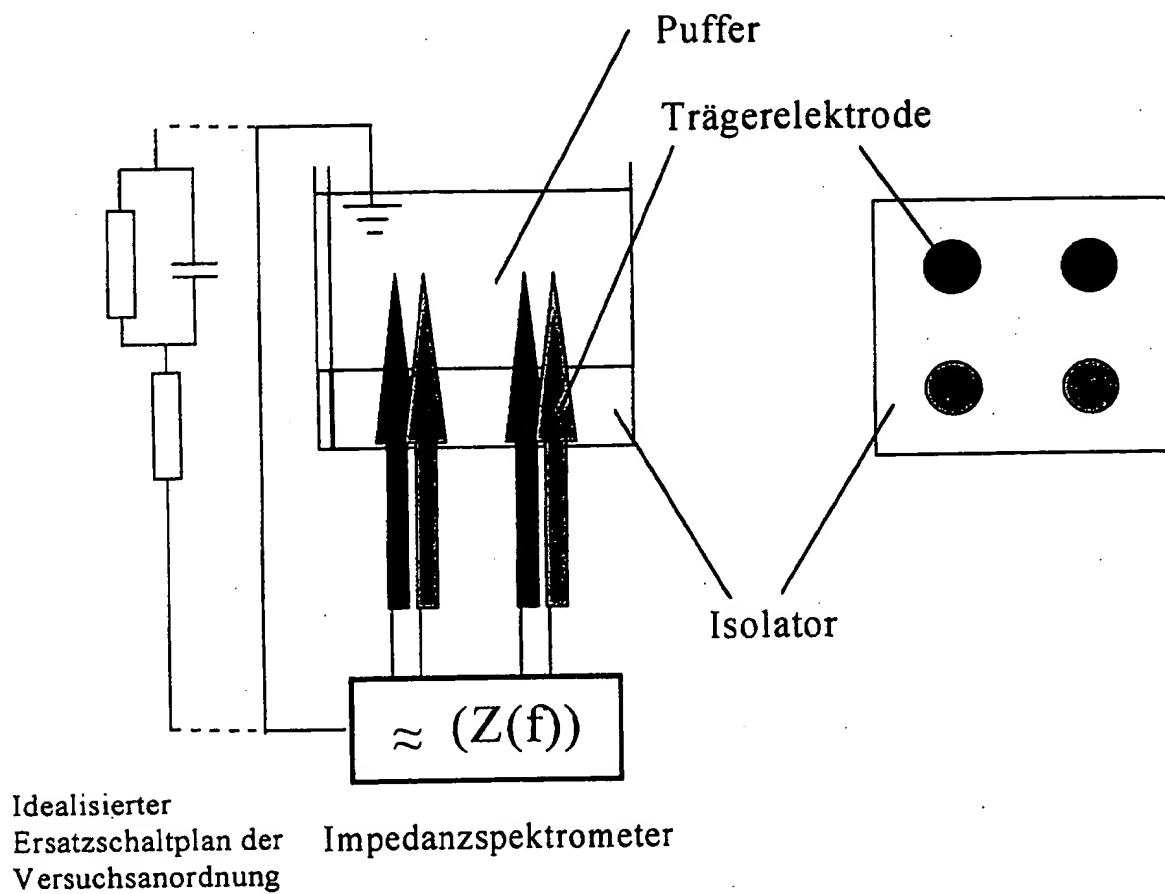


Fig. 4

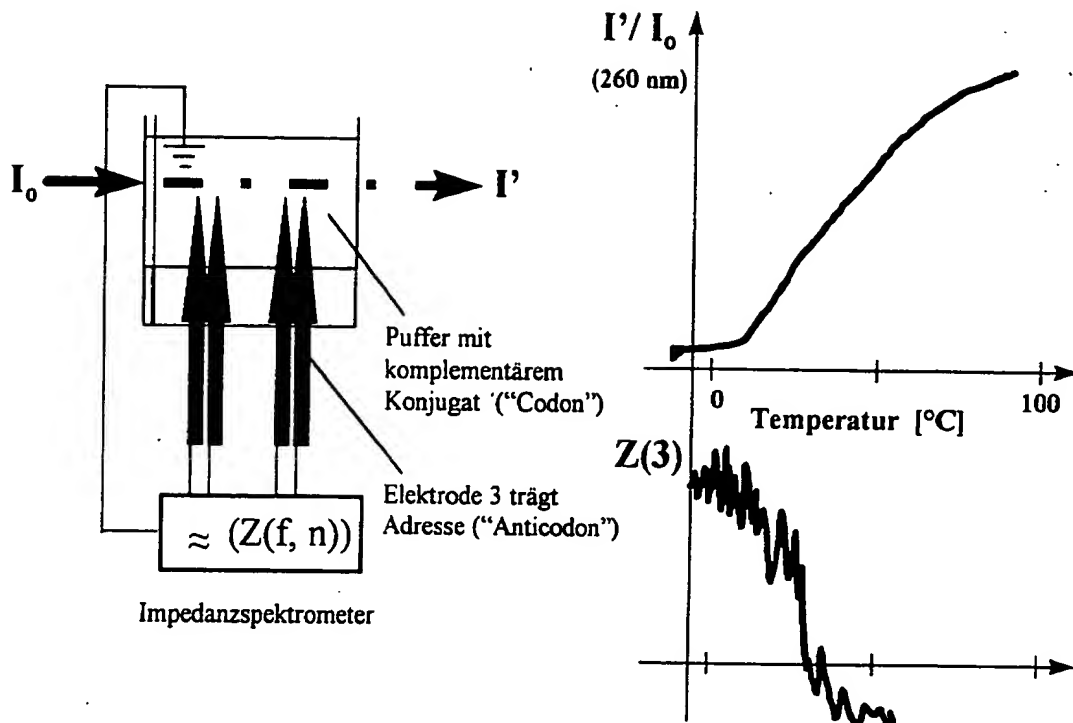


Fig. 5

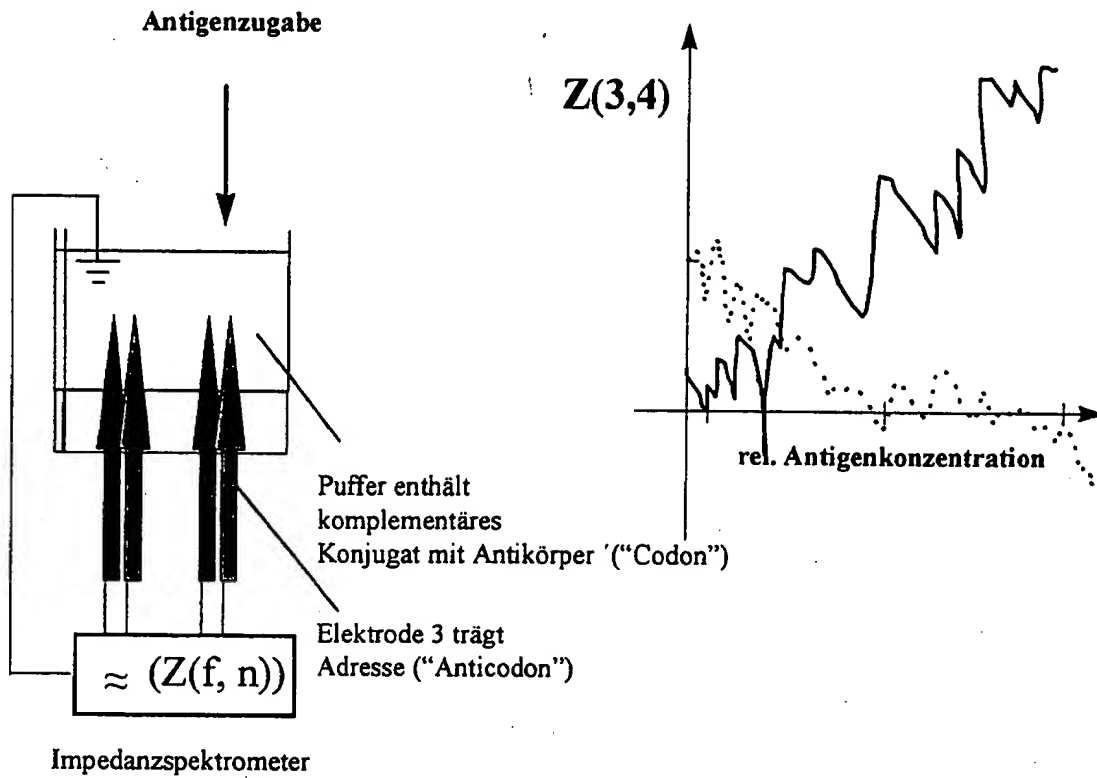


Fig. 6

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)